Aus: Der Neurologischen Klinik und Poliklinik
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof.Dr.med. H. Schliack

DIE WIRKUNG VON AMANTADIN-HYDROCHLORID AUF DIE MOTORISCHE ENDPLATTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Charissis, Georgios
aus Athen

1975

Aus: Der Neurologischen Klinik und Poliklinik
im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof.Dr.med. H. Schliack

DIE WIRKUNG VON AMANTADIN-HYDROCHLORID AUF DIE MOTORISCHE ENDPLATTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Charissis, Georgios
aus Athen

Referent: Prof.Dr.med. H.Schliack
Korreferent: Professor Dr. O.-J. Grüsser

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25.Juni 1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei V/ZUD — Kelchstraße 31 · 1000 Berlin 41

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	4
2.	Methodik	7
3.	Ergebnisse	12
4.	Diskussion	22
5.	Zusammenfassung	28
6.	Literaturverzeichnis	29

1. EINLEITUNG und FRAGESTELLUNG

Amantadin-Hydrochlorid ist das Salz eines Amins, bei dem sich die positiv geladene Aminogruppe an der Spitze eines stabilen Käfigs aus zehn Kohlenstoffatomen befindet.

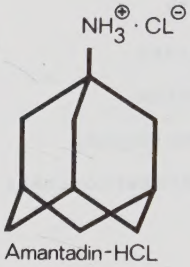

Abb.1: Schematische Darstellung der Molekülkonfiguration von Amantadin-Hydochlorid

Seit 1969 wird Amantadin-Hydrochlorid mit Erfolg zur Behandlung des Parkinson-Syndroms eingesetzt (1). Aus den bisherigen Untersuchungen über die Pathogenese des Parkinsonismus geht hervor, daß die Symptomatik der Krankheit zumindest teilweise durch den Ausfall einer inhibitorischen dopaminergen nigro-striatalen Bahn verursacht wird, wodurch es zum Überwiegen von cholinergen im Striatum lokalisierten Neuronen kommt (2, 3).
Aufgrund dieser Befunde liegt es nahe, nach einer anticholinergen oder dopaminergen Amantadinwirkung im Striatum zu recherchieren. Bisher suchten mehrere Arbeitsgruppen nach einem Angriffspunkt von Amantadin an der dopaminergen Synapse. Zwei von mehreren möglichen präsynaptischen Effekten standen dabei im Vordergrund der Untersuchungen, eine verstärkte Freisetzung von Dopamin oder

eine Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin an der Nervenendigung.
GRELAK (4) und STRÖMBERG (5, 6) fanden in ihren Untersuchungen Hinweise für eine verstärkte Freisetzung von Dopamin durch Amantadin.
Hinweise auf eine Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin an der präsynaptischen Nervenendigung durch Amantadin wurde dagegen von HEIMANS (7) gefunden.
Eine endgültige Entscheidung über den genauen Wirkungsmechanismus von Amantadin an den dopaminergen Synapsen des Striatums ist aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse zur Zeit nicht möglich.

Es wurde in der bisherigen Literatur wenig untersucht, ob die Wirkung von Amantadin beim Parkinsonismus auf einer anticholinergen Eigenschaft des Medikaments beruht. Bei Experimenten zu einer möglichen anticholinergen Amantadinwirkung an peripheren Synapsen ergibt sich überwiegend der Hinweis, daß Amantadin keinen Effekt auf muskarinartige Acetylcholinrezeptoren hat (4, 7, 8). Von HERZ et al. (9) und STEINER (1o) werden die cholinergen Synapsen des Striatums aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften als muskarinartig eingestuft. Außerdem fand GRELAK (4), daß Amantadin auf einen durch Oxotremorin induzierten Tremor keine antagonistische Wirkung besitzt. Alle diese Argumente unterstützen die Annahme, daß die zentrale Wirkung von Amantadin nicht auf anticholinerge Eigenschaften zurückzuführen ist. Wiederum an peripheren Synapsen fanden HEIMANS et al. (7), daß Amantadin auf nikotinartige Rezeptoren doch einen antagonistischen Effekt ausübt. Es bewirkt eine deutliche Hemmung der Wirkung von Nikotin bzw. von elektrischer Stimulation der präganglionären Nerven am Ösophaguspräparat vom Hühnchen.

Um Informationen über eine mögliche Interaktion von Amantadin und Acetylcholin an einer anderen peripheren nikotinartigen Synapse zu erhalten, haben wir die Wirkung von Amantadin an

der motorischen Endplatte der quergestreiften Muskulatur untersucht. Diese Synapse bietet sich an, weil sie einerseits leicht zugänglich ist und andererseits ihre pharmakologischen Eigenschaften gut bekannt sind (12, 13, 14,15). Die bisherigen Vorstellungen über den Aufbau der motorischen Endplatte, d.h. die Kenntnis über die Subsysteme der neuromuskulären Synapse, ermöglichen es uns, die Wirkung einer Droge auf die neuromuskuläre Übertragung zu charakterisieren.

Präsynaptisch ergeben sich Angriffspunkte auf die Synthese, Speicherung in Vesikeln und Freisetzung von Acetylcholin. Die möglichen postsynaptischen Angriffspunkte sind entweder der Acetylcholinrezeptor oder die Interaktion mit der Acetylcholinesterase.
In unseren Untersuchungen verwandten wir die Methode der intrazellulären Registrierung des Membranpotentials der Muskelfaser und der Miniaturendplattenpotentiale.
Damit lassen sich Aussagen über einen möglichen postsynaptischen Wirkungsmechanismus von Amantadin machen.

2. METHODIK

Die Experimente führten wir am isolierten Nerv-Muskel-Präparat durch. Dafür wurden weiße Mäuse vom Typ CF1 und einem Gewicht von 25 - 3o g durch intraperitoneale Injektion eines Chloralose-Urethan-Gemisches narkotisiert und dann ein 1 cm breiter Zwerchfellstreifen mit zugehörigem Nervus phrenikus entnommen. Mit Hilfe von Igelstacheln wurde in einer Badekammer das Präparat an der Rippe und am Zentrum tendineum so fixiert, daß das Präparat nicht mehr als um 1/4 seiner Ruhelänge gedehnt wurde.
Das Fassungsvermögen des Badgefässes betrug 1,5 - 2 ml. Die Badflüssigkeit hatte folgende Zusammensetzung: in mMol/l NaCl, 118,5; $NaHCO_3$, 24,9; KH_2PO_4, 1,12; KCl, 4,74; $CaCl_2$, 2,54; $MgSO_4$, 1,12; Glukose, 5,o; Cholinchlorid, 4,8 x $1o^{-2}$.

Die Lösung wurde ständig mit einem Gemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 durchperlt. Der pH betrug im Mittel 7,4. Die Temperatur wurde bei $2o^o$ C konstant gehalten.

Zum Versuch wurde die Badflüssigkeit durch Lösungen von Amantadin-Hydrochlorid ersetzt in einem Konzentrationsbereich von $1o^{-8}$ bis $1o^{-3}$ g/ml (5,32 x $1o^{-8}$ bis 5,32 x $1o^{-3}$ Mol/l). Der Austausch der Badlösungen wurde mittels eines Perfusors durchgeführt, der innerhalb einer Minute das drei- bis vierfache des Badvolumens erschütterungsfrei wechselte.
Es kann angenommen werden, daß mit dieser Methode in den verschiedenen Versuchen eine jeweils konstante Amantadinkonzentration der Badlösung erreicht wurde.

Da die Diffusionszeit zu den Muskelfasern der tiefer liegenden Schichten und damit die Konzentration von Amantadin in deren unmittelbarer Nähe offensichtlich sehr inkonstant war, wurde nur von den oberflächlichen Muskelfasern abgeleitet.

Mit Hilfe von Ling-Gerard-Elektroden, die mit einer 3 molaren Kaliumcitratlösung gefüllt waren und einen Widerstand von ungefähr 1o MOhm aufwiesen, wurden das Ruhemembranpotential

(R.m.p.) und die Miniaturplattenendpotentiale (M.e.p.p.) intrazellular registriert. Die Potentiale wurden nach Impedanzwandlung sowie DC und AC Vorverstärkung auf einen Kathodenstrahloszilloskopen verfolgt und gleichzeitig auf einem AMPEX-Analogspeicher aufgenommen. Die Potentiale von Fasern, deren R.m.p. für die Dauer eines Versuches stabil waren, wurden später mit einer TÖNNIES-REKORDINE-Kamera aufgenommen und die Höhe des R.m.p. und die Amplitude und Frequenz der M.e.p.p. ausgemessen.
Bei der Auswertung wurden nur Registrierungen von Muskelfasern verwandt, deren R.m.p. bei mindestens 55 mV lag. Das höchste registrierte R.m.p. betrug 75 mV. Der Mittelwert aller gemessenen R.m.p. lag bei 63,2 $\pm$ 6 mV. Die Amplitude und die Anstiegssteilheit der M.e.p.p. dienten als Kriterium dafür, daß aus unmittelbarer Nähe der Endplatten abgeleitet wurde.

Es wurden wiederum nur Registrierungen ausgewertet, bei denen die M.e.p.p. eine Höhe von mindestens o,5 mV erreichten.

Zunächst wurden in amantadinfreier Lösung Kontrollwerte von R.m.p. und M.e.p.p. gewonnen. Nach dem Ende des Austausches der Badflüssigkeit mit amantadinhaltiger Lösung wurden beide Meßgrößen in Abstand von einer Minute, 2 Minuten, 4 Minuten, 6 Minuten u.s.w. registriert. Auf diese Weise konnte nur die Wirkung der Dauerapplikation von Amantadin erfaßt werden, und nicht Effekte, die sich in viel kürzeren Zeiträumen abspielten.
In den meisten Versuchen wurde nach 1o Minuten die Badflüssigkeit wieder gegen Krebs-Ringer-Lösung ausgetauscht. In einem Teil der Versuche wurde das Verhalten des R.m.p. und der M.e.p.p. allerdings bis zu 45 Minuten beobachtet, um eine mögliche Desensibilisierung der Endplatte durch Amantadin zu erfassen. Nach Beendigung jedes Versuches wurde eine Erholungspause von 3o Minuten eingehalten, um eine vollständige Erholung der Präparate zu sichern.

Bei allen Versuchen wurde die Spontanfrequenz der M.e.p.p. ausgezählt. Da sich hieraus kein Hinweis auf eine mögliche präsynaptische Wirkung von Amantadin ergab, wurde zusätzlich das Verhalten der M.e.p.p.-Frequenz unter Provokation mit einer 1o mM Kaliumlösung bestimmt.

Selten war das R.m.p. einer Faser so lange stabil, daß der Effekt verschiedener Amantadinkonzentrationen auf R.m.p. und M.e.p.p. nacheinander an einer Endplatte bestimmt werden konnte. Zur Erstellung der Dosis/Wirkungs-Kurve wurde deshalb für jede Amantadinkonzentration der Mittelwert aus 4 bis 1o verschiedenen Faserregistrierungen gebildet. Die Veränderung der Maßgrößen wurde dabei in Prozent vom jeweiligen Ausgangswert angegeben.

Um die Amplitude der M.e.p.p. unabhängig von der aktuellen Höhe des R.m.p. miteinander vergleichen zu können, multiplizierten wir deren Werte mit einem von MARTIN (11) angegebenen Korrekturfaktor. Dieser Faktor trägt der Tatsache Rechnung, daß bei Veränderung des R.m.p. immer eine korrespondierende Veränderung der M.e.p.p.-Amplitude auftritt. Zwischen beiden Werten besteht eine lineare Beziehung, die für die neuromuskuläre Synapse zuerst von FATT und KATZ (16) gefunden wurde. Der Faktor lautet:

$$k = \frac{R.m.p._{stand.} - R.m.p._{equ.}}{R.m.p._{akt.} - R.m.p._{equ.}}$$

Hierbei ist: $R.m.p._{stand.}$ = der gemessene Kontrollwert zu Beginn jedes Versuchs

$R.m.p._{equ.}$ = das Gleichgewichtspotential des Endplattenpotentials (-15 mV)

$R.m.p._{akt.}$ = das aktuell gemessene R.m.p.

Aus der von uns gewonnenen Dosis/Wirkungs-Kurve bestimmten wir die Dissoziationskonstante der Reaktion von Amantadin

mit dem postsynaptischen Rezeptor, unter der Voraussetzung folgender, z.T. vereinfachender Annahmen:

1. Die Reaktion von Acetylcholin mit dem Rezeptor wird als eine Enzym-Substrat-Reaktion betrachtet, so daß die von MICHAELIS und MENTEN angegebenen Gleichungen zur Interaktion von Enzymen mit ihren Sunstraten und Inhibitoren zu Grunde gelegt werden können.

2. daß Amantadin und Acetylcholin denselben Angriffspunkt am Rezeptor haben. Im Fall der blockierenden Wirkung des Amantadin an der postsynaptischen Membran, kann Amantadin dann als kompetitiver Antagonist behandelt werden. Zur Berechnung der Dissoziationskonstante beziehen wir uns nur auf die blockierende Wirkung von Amantadin, d.h. zur Berechnung wurden die mit Hilfe des oben angegebenen Korrekturfaktors skalierten M.e.p.p.-Amplitude verwandt, diese sind ein Ausdruck für die blockierende Wirkung von Amantadin (s.u. Ergebnisse).

3. Die depolarisierende Wirkung des präsynaptisch spontan freigesetzten Acetylcholins wird als Maß für die Zahl der amantadinfreien Rezeptoren gesetzt. Dabei wird impliziert, daß die gemessene Depolarisation linear proportional der Zahl der jeweils gebildeten Acetylcholin-Rezeptor-Komplexe ist.

4. Die unten angegebenen Kriterien gelten nur unter Gleichgewichtsbedingungen.

5. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante soll unter nichtkompetitiven Bedingungen erfolgen. Als Voraussetzung dafür wird eine so langsame Dissoziation des Amantadin-Rezeptor-Komplexes angenommen, daß während der Anstiegszeit eines M.e.p.p. nur ein zu vernachlässigender Teil der von Amantadin besetzten Rezeptoren frei wird. Zur Berechnung der Dissoziationskonstante stützen wir uns auf die von KRUCKENBERG und BAUER angegebenen (17) folgenden Gleichungen:

Nach dem Massenwirkungsgesetz gilt:

$$\frac{(I) \times (R)}{(IR)} = k_i$$

wobei I die Amantadinkonzentration, R die Zahl der amantadinfreien, IR die Zahl der mit Amantadin besetzten Rezeptoren bedeuten. Wenn mit R_o die Gesamtzahl der Rezeptoren bezeichnet wird, ergibt sich eine Umformung von

$$\frac{R_o}{R} = 1 + \frac{(I)}{k_i}$$

oder, da nach Voraussetzung R proportional A_i (= mittlere Amplitude der M.e.p.p. bei Amantadinkonzentration I ist),

$$\frac{A_o}{A_i} = 1 + \frac{(I)}{k_i} .$$

(A_o = mittlere Amplitude in amantadinfreier Lösung).
A_o/A_i als Funktion von I sollte mithin eine Gerade mit der Steigerung $1/k_i$ ergeben.
Einsetzen der mittleren Amplituden A_1 und A_2 bei zwei Amantadinkonzentrationen I_1 und I_2 in der letzten Gleichung und nachfolgende Division und Umformung ergibt

$$k = \frac{(I_2)A_2 - (I_1)A_1}{A_1 - A_2}$$

3. ERGEBNISSE

In sicherer Entfernung von der Endplatte läßt sich keine Wirkung von Amantadin auf das R.m.p. der Muskelfaser nachweisen. Auch bei der höchsten von uns verwandten Konzentration von $1o^{-3}$ g/ml führt Amantadin nicht zu einer unspezifischen Depolarisation, wenn das R.m.p. nahe zum Ansatz der Muskelfasern am Zentrum tendineum des Diaphragmas registriert wird. Dagegen findet sich ein sicherer Effekt von Amantadin auf R.m.p. und M.e.p.p.-Amplitude, wenn aus unmittelbarer Nähe der Endplatte intrazellulär registriert wird.
Im Konzentrationsbereich von $1o^{-8}$ bis $1o^{-6}$ g/ml zeigt Amantadin noch keine Wirkung auf die beiden genannten Meßgrößen.

Bei einer Konzentration von $1o^{-5}$ g/ml kommt es bei einigen Endplatten zu einer leichten Reduktion beider Größen, während andere unbeeinflußt bleiben.
Ein weiteres Ansteigen der Konzentration führt zu einer dosisabhängigen Depolarisation der Muskelmembran und gleichzeitiger Abnahme der M.e.p.p.-Amplituden.

Die Wirkung von Amantadin bei einer Konzentration von $1o^{-4}$ g/ml zeigt die Originalregistrierung in Abb.2. Nach dem Auswaschen ist der Effekt von Amantadin immer reversibel.

In Abb.3 ist das Verhalten von R.m.p. und M.e.p.p. in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Art der Applikation von Amantadin läßt eine Beurteilung des frühen Zeitverlaufs (ca. 3o sec.) in unseren Versuchen nicht zu. Nach einer Minute ist die Wirkung auf R.m.p. und M.e.p.p.-Amplitude schon voll ausgebildet.

Wirkung von Amantadin (10^{-4} g/ml) auf die M. e. p. p. - Amplitude (f 19)

Lösung	min	R. m. p. (mV)	M. e. p. p. -Amplitude
Ringer	0'	55	
Amantadin	4'	42	
Amantadin	10'	42	
Auswaschen →			
Ringer	2'	44	
Ringer	10'	52	

Abb. 2: Dargestellt ist die Wirkung von Amantadin-Hydrochlorid (1o-4 g/ml) auf R.m.p. und M.e.p.p.-Amplitude, letzteres anhand einer Originalregistrierung. Die beiden letzten Reihen zeigen die Erholung beider Größen nach dem Auswaschen von Amantadin.

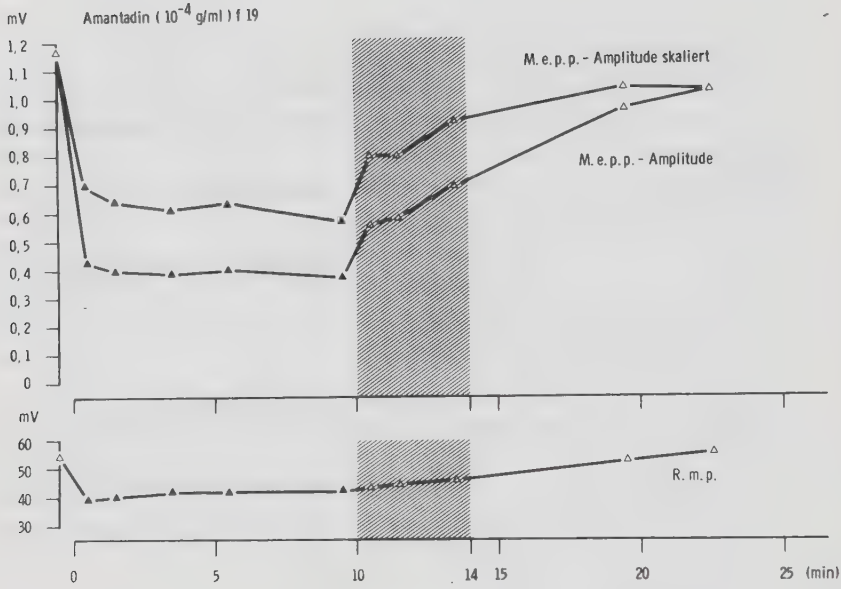

Abb.3: Zeitverlauf von M.e.p.p.-Amplitude (▲), korrigierten Werten (s.Methodik) der M.e.p.p.-Amplitude (▲) und R.m.p. (▲) bei Applikation von Amantadin (▲) und nach dem Auswaschen (▲). Die schraffierte Ebene kennzeichnet die Phase des Auswaschens von Amantadin.

Während der gesamten Applikationsdauer (1o Minuten) bleibt das R.m.p. stabil. Auch bei längerer Applikation der Droge (bis zu 3o Minuten) bei mehreren unserer Versuche läßt sich keine Tendenz zur Repolarisation des R.m.p. feststellen. Da bei Dauerapplikation einer Droge die Repolarisation des R.m.p. das Kriterium einer Desensibilisierung mit langsamer Zeitkonstante ist, läßt sich zumindest hieraus kein solcher

Effekt von Amantadin auf die postsynaptische Membran feststellen.

Wie Abb.3 zeigt, geht die Erholung des Präparats nach dem Auswaschen der Droge nur relativ langsam vonstatten. Nach 13 Minuten hat die Amplitude der M.e.p.p. 85 % ihrer Ausgangsgröße erreicht.
In Abb. 3 nimmt die Amplitude der M.e.p.p. nach einer Minute um 66,5 % ab, während das R.m.p. nur um 27 % fällt.
Amantadin führt also zu einer stärkeren Abnahme der M.e.p.p.-Amplitude, als allein aus der Höhe der entsprechenden Membrandepolarisation zu erklären wäre.
Dies demonstriert der Kurvenverlauf in Abb. 3 für die skalierten Werte der M.e.p.p.-Amplitude. Man erhält sie, indem man den Effekt der Membrandepolarisation auf die M.e.p.p.-Amplitude mit Hilfe des in der Methodik angegebenen Korrekturfaktors errechnet.
Wäre die beobachtete Amplitudenabnahme die alleinige Folge der Membrandepolarisation durch Amantadin, würde sich mit Hilfe dieser Korrektur keine Abweichung der M.e.p.p.-Amplitude von ihrem Ausgangswert in amantadinfreier Lösung ergeben. Der Kurvenverlauf der skalierten Werte der M.e.p.p.-Amplitude zeigt, daß Amantadin nicht nur eine depolarisierende, sondern auch eine blockierende Wirkung auf die postsynaptische Membran hat.

Abb. 4 zeigt die Amantadinwirkung in einer Konzentration von $1o^{-3}$g/ml. 2o bis 3o sec nach Applikation kommt es zu einer vollständigen Blockade der M.e.p.p., die nach dem Auswaschen für einige Minuten fortbesteht.

Abb. 5 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Amantadin auf das R.m.p. und die M.e.p.p.-Amplitude. Die aufgetragenen Punkte repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 4 bis 1o Messungen. Zur Mittelwertbildung werden die Werte herangezogen, die eine Minute nach der Phase des Wechsels zu amantadinhaltiger Lösung registriert werden. Es kann

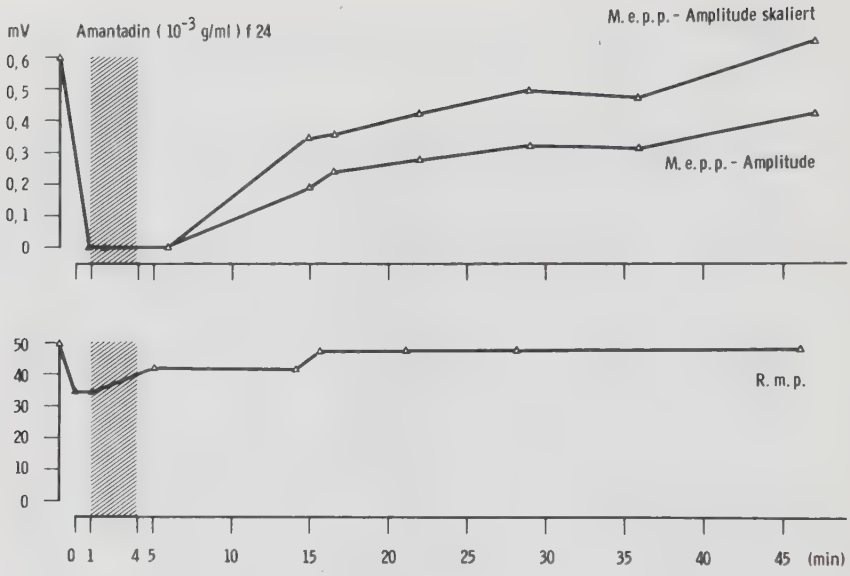

Abb.4: Darstellung derselben Größen wie Abb.3. Die Abbildung zeigt die Reaktion auf eine Amantadinkonzentration von $1o^{-3}$ g/ml.

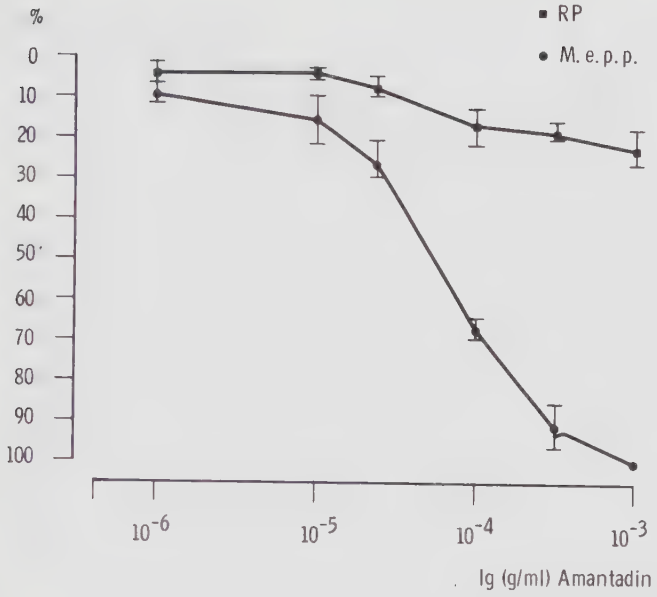

Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit vom M.e.p.p.-Amplitude und R.m.p. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert von jeweils 4 - 1o Messungen mit seiner zugehörigen Standardabweichung. Angegeben ist die prozentuale Abweichung beider Größen vom Kontrollwert. o % bedeutet keine Abweichung vom Ausgangswert in amantadinfreier Lösung.

angenommen werden, daß zu diesem Zeitpunkt Gleichgewichtsbedingungen erreicht sind. Dargestellt ist der prozentuale Abfall gegenüber dem Kontrollwert mit zugehöriger Standardabweichung. Ein 1oo% Abfall bedeutet, daß die Amplitude der M.e.p.p. zu klein ist, um sie noch vom Rausch zu unterscheiden.

Die konzentrationsabhängige Reduktion der Amplitude der M.e.p.p. ist hauptsächlich durch eine blockierende Amantadinwirkung auf die postsynaptische Membran verursacht. Im Vergleich dazu ist die Abnahme der M.e.p.p.-Amplitude als Folge der depolarisierenden Wirkung von Amantadin auf die postsynaptische Membran gering. Dies zeigt Abb.6. Dort ist der registrierte sowie der zugehörige mit Hilfe des oben genannten Korrekturfaktors errechnete Wert der M.e.p.p.-Amplitude in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen.
Bei genauer Betrachtung überwiegt der Depolarisationseffekt auf die M.e.p.p.-Amplitude im Bereich der niedrigeren Konzentrationen (von $1o^{-6}$ bis $1o^{-5}$ g/ml). Bei höheren Konzentrationen dagegen verschiebt sich das Bild, der blockierende Effekt von Amantadin auf die postsynaptische Membran überwiegt deutlich.

Unter den in der Methodik (s.S. 7) angegebenen Voraussetzungen wird die Dissoziationskonstante des Amantadin-Rezeptor-Komplexes errechnet. Die Abb.7. zeigt die Abhängigkeit des Faktors A_o/A_i von der Konzentration. Für A_i werden hierbei die Mittelwerte der skalierten M.e.p.p.-Amplituden aus Abb.6 verwandt. Die Werte von Konzentrationen höher als $1o^{-4}$ g/ml können zur Berechnung nicht benutzt werden, da bei so starker Blockade durch Amantadin das Ausmessen der M.e.p.p.-Amplitude unsicher oder nicht mehr möglich ist.
Durch die gewonnenen Meßpunkte läßt sich eine Gerade legen, aus deren Steigung sich die Dissoziationskonstante k_i des Amantadin-Acetylcholinrezeptor-Komplexes zu
$1{,}6 \times 1o^{-4}$ g/ml ($8{,}4 \times 1o^{-4}$ M/l) errechnet.

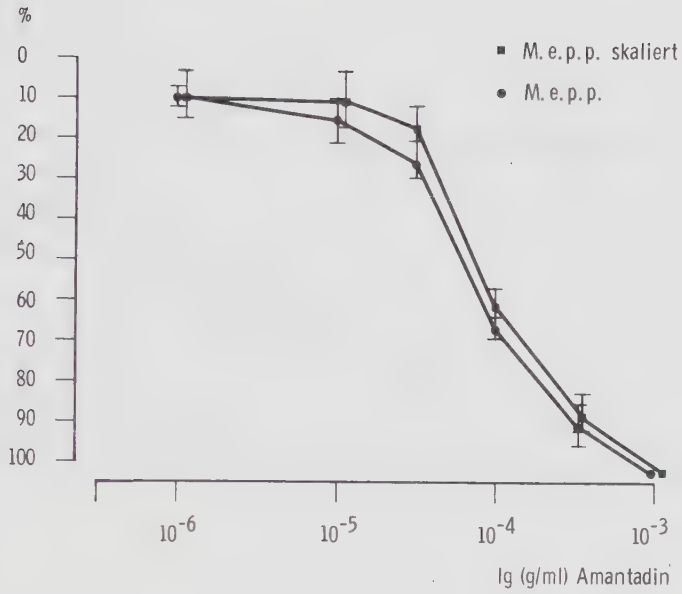

Abb. 6: Vergleich von Konzentrationsabhängigkeit von M.e.p.p.-Amplitude und zugehörigem korrigierten Wert (s.Methodik). Dargestellt ist der prozentuale Abfall vom Kontrollwert. Ein 1oo% Abfall bedeutet eine so starke Reduktion der M.e.p.p.-Amplitude, daß die M.e.p.p. im Rausch nicht mehr nachweisbar sind.

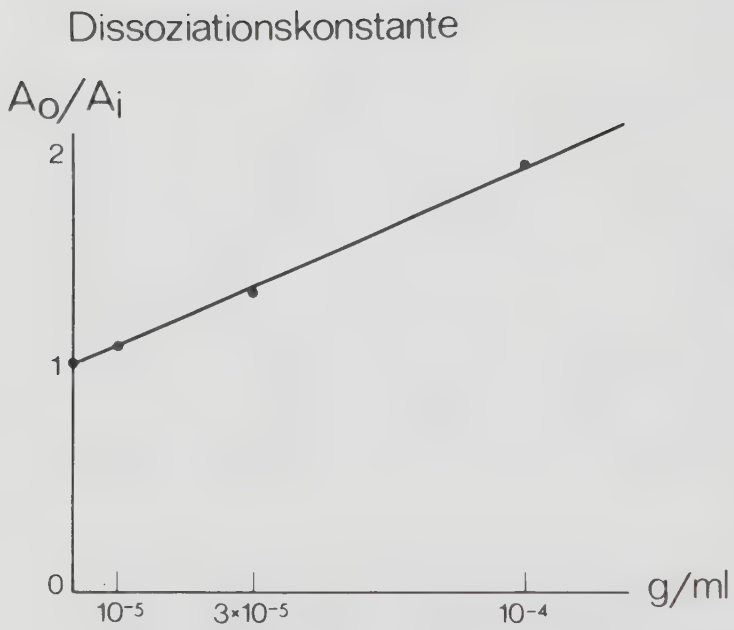

Abb. 7: Berechnung der Dissoziationskonstante des Amantadin-Rezeptor-Komplexes. Dargestellt ist die Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten A_o / A_i aus der M.e.p.p.-Amplitude in amantadinfreier Lösung(A_o)und der Amplitude in amantadinhaltiger Lösung (A_i). Zur Bildung wurden jeweils die Mittelwerte aller Messungen bei diesen Konzentrationen verwandt.

Auch bei den höchsten von uns verwandten Konzentrationen zeigt Amantadin keinen Einfluß auf die Frequenz der M.e.p.p. Gegenüber der mittleren M.e.p.p.-Frequenz in amantadinfreier Lösung 1,19 $\pm$ o,6 sec beträgt die Frequenz bei einer Konzentration von $1o^{-4}$ g/ml 1,23 $\pm$ o,68 sec. Unter Provokation mit einer 1o mM Kaliumlösung läßt sich allerdings doch ein Effekt von Amantadin auf die präsynaptische Freisetzung der Acetylcholin-Vesikel nachweisen. Gegenüber dem Kontrollwert von 1,19/sec beträgt die mittlere M.e.p.p.-Frequenz in 1o mM Kaliumlösung 2,25/sec. Appliziert man gleichzeitig Amantadin ($1o^{-4}$ g/ml) und Kalium (1o mM), so kommt es zu einem zusätzlichen Anstieg der M.e.p.p.-Frequenz auf 3,9/sec. Die Wirkung von Amantadin scheint also nicht nur auf die postsynaptische Membran beschränkt zu sein. Aufgrund der oben genannten Befunde muß man annehmen, daß Amantadin außerdem einen - wenn auch gering ausgeprägten - präsynaptischen Angriffspunkt hat.

4. D I S K U S S I O N

Die Wirkung von Amantadin an der postsynaptischen Membran ist chrakterisiert durch einen gering ausgeprägten depolarisierenden, d.h. cholinergen Effekt, und einen im Vergleich dazu stärkeren blockierenden, d.h. anticholinergen Effekt.

Verglichen mit anderen an der Endplatte postsynaptisch angreifenden Substanzen ist Amantadin relativ gering wirksam. Eine depolarisierende Wirkung tritt erst bei einer Konzentration von $5{,}3 \times 10^{-5}$ M/l auf, und bei $5{,}3 \times 10^{-3}$ M/l erreicht die Depolarisation des R.m.p. im Durchschnitt nur 20 % des Ausgangswertes. NASTUK (18), GISSEN und NASTUK (19) fanden im Vergleich dazu am Sartoriusmuskel des Frosches für andere depolarisierende Substanzen wie Carbamylcholin, Succinylcholin und Dekamethonium eine deutlich stärkere depolarisierende Wirkung.
Bei einer Konzentration von $2{,}7 \times 10^{-4}$ M/l depolarisiert zum Beispiel Carbamylcholin die postsynaptische Membran um ca. 70 %; Succinylcholin erreicht bei einer Konzentration von 3×10^{-5} M/l eine Depolarisation um ca. 65 % und Dekamethonium, das die geringste depolarisierende Wirkung hat, depolarisiert bei einer Konzentration von $1{,}5 \times 10^{-4}$ M/l die postsynaptische Membran noch um ca. 50 %.

Vergleicht man die blockierende Amantadinwirkung mit der von d-Tubocurarin, so ist Amantadin etwa um 1000mal weniger wirksam. Zum Beispiel unterdrückt d-Tubocurarin bei einer Konzentration von 1×10^{-6} g/ml die M.e.p.p. vollständig (17); diesen Effekt erreicht man mit Amantadin erst bei einer Konzentration von 10^{-3}g/ml.

Versucht man die Wirkung von Amantadin auf den postsynaptischen Rezeptor nach den von ARIENS (20, 21) im Rahmen seiner "Okkupationstheorie" aufgestellten Kriterien zu charakterisieren, so handelt es sich um einen partiellen Agonisten mit geringer "intrinsic activity" (Eigenwirkung) und geringer

"Affinität" zum Rezeptor. Hierbei ist Affinität eine Substanzkonstante, die bei gegebener Konzentration die Menge der sich bildenden Droge-Rezeptor-Komplexe determiniert, und "Eigenwirkung" ist eine Substanzkonstante, die den Effekt eines gebildeten Droge-Rezeptor-Komplexes angibt. Dieser Effekt ist bei dem Acetalcholinrezeptor die Leitfähigkeitsänderung der postsynaptischen Membran für die Kalium- und Natriumionen.

Um eine Aussage über beide Größen machen zu können, wird eine lineare Beziehung zwischen der Leitfähigkeitsänderung und der Menge der jeweils gebildeten Droge-Rezeptor-Komplexe angenommen. Dies ist eine der schon in der Methodik (s.S.7) angegebenen Bedingungen zur Berechnung der Dissoziationskonstante. Diese Konstante beträgt für Amantadin 8,4 x $1o^{-4}$ M/l. Unter ähnlichen experimentellen Bedingungen bestimmten KRUCKENBERG und BAUER (17) die Dissoziationskonstante für d-Tubocurarin zu 3,9 x $1o^{-7}$ M/l. Verglichen mit d-Tubocurarin hat Amantadin eine deutlich kleine Affinität zum Acetalcholinrezeptor.

Für Carbamylcholin bestimmten HIGMAN et al. (22) am monozellulären Elektroplax vom Electrophorus electricus die Dissoziationskonstante zu 4,4 x $1o^{-5}$ M/l.

In ihrer Größenordnung liegt sie in der Nähe der Konstante für Amantadin; die sehr viel stärkere depolarisierende Wirkung von Carbamylcholin an der Endplatte wäre durch eine höhere "intrinsic activity" des Carbamylcholin-Rezeptor-Komplexes zu erklären.

Die mit unserer Methode gewonnene Dissoziationskonstante läßt keine sichere Aussage über die Konstanten der wirklichen Reaktion zwischen Droge und Rezeptormolekül zu, denn es gibt keinen experimentellen Nachweis für die von uns angenommenen vereinfachenden Voraussetzungen. Dazu gehören z.B. die lineare Beziehung zwischen der Depolarisation und der Menge der Droge-Rezeptor-Komplexe sowie der postulierte gemeinsame Angriffspunkt von Amantadin und Acetylcholin an der postsynap-

tischen Membran, d.h., daß Amantadin und Acetylcholin sich kompetitiv am Rezeptor verhalten.

Die blockierende Wirkung einer Droge kann prinzipiell durch zwei verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden, entweder durch kompetitive Inhibition des Acetylcholinrezeptors, oder durch Rezeptor-Inaktivierung (Desensibilisierung). Eine Desensibilisierung läßt sich an der Abnahme der Reaktion auf einen Agonisten nach vorheriger Applikation desselben oder eines anderen Agonisten nachweisen. Die Inaktivierung des Acetylcholinrezeptors zeigt sich außerdem bei der Dauerapplikation eines Agonisten, indem die ursprünglich erreichte Depolarisation der Membran nicht aufrechterhalten wird. Von den vorher genannten depolarisationshemmenden Substanzen hat Dekamethonium die stärkste Fähigkeit zur Rezeptorinaktivierung. Bei Dauerapplikation dieser Substanz fanden GISSEN und NASTUK (19) eine ausgeprägte Repolarisation der postsynaptischen Membran. Für Succinylcholin und Carbamylcholin, die beide eine stärkere depolarisierende Wirkung als Dekamethonium besitzen, trifft dasselbe in geringerem Ausmaß zu.
Für Amantadin fanden wir keine Tendenz zur Repolarisation des R.m.p. bei fortdauernder Applikation. Gemessen am Kriterium der Repolarisation bei Dauerapplikation, besitzt Amantadin keine rezeptorinaktivierende Wirkung. Die blockierende Wirkung von Amantadin an dem postsynaptischen Acetylcholinrezeptor läßt sich demnach nicht durch eine Desensibilisierung des Acetylcholinrezeptors erklären.

Es wird allgemein gefunden, daß es sich bei den nikotinartigen Acetylcholinrezeptoren der neuromuskulären Synapse von verschiedenen Muskeln derselben Spezies wie auch von denselben Muskeln verschiedener Spezies um Isorezeptoren handelt. Wenn auch HUBBARD und QUASTEL (12) einen Teil der unterschiedlichen Wirkung derselben Droge bei verschiedenen Spezies auf Unterschiede in den experimentellen Bedingungen zurückführen, so gibt es doch sichere Hinweise dafür, daß die Wirkungscharakte-

ristik einer Droge von den untersuchten Spezies abhängt. Es fanden ZAIMIS (23) und BARAKA (24) für d-Tubocurarin, daß die Dosis zum Erreichen eines neuromuskulären Blocks stark mit den verschiedenen Spezies variiert. Dasselbe gilt für Succinylcholin und Dekamethonium. ZAIMIS (23), THESLEFF (25) und BARAKA (24) fanden außerdem, daß sich für Dekamethonium das relative Ausmaß der depolarisierenden Wirkung, der Acetylcholin-Rezeptor-Inaktivierung oder auch der kompetitiv inhibitorischen Wirkung in Abhängigkeit von den untersuchten Spezies verändert. Auf dem Hintergrund dieser experimentellen Befunde ist eine einfache Übertragung der Wirkungscharakteristik des Amantadin von der neuromuskulären Synapse der Maus auf die des Menschen nicht zu vertreten.

Die von uns an der neuromuskulären Synapse der Maus bestimmte Wirkungscharakteristik von Amantadin läßt sich auf den Hintergrund dieser experimentellen Befunde nicht einfach auf die neuromuskuläre Synapse des Menschen übertragen.

Zusätzlich zeigt sich aufgrund klinischer Beobachtungen an Parkinson-Patienten bei einer täglichen Gabe von 2oo - 3oo mg kein überschwelliger Effekt von Amantadin auf die neuromuskuläre Übertragung. Genaue Untersuchungen über die Höhe des Blutspiegels bei oraler Gabe von Amantadin in dieser Dosierung existieren nicht, BLEIDNER et al. (26) geben an, daß Amantadin zu 1oo % aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und zum größten Teil in nicht-metabolisierter Form wieder ausgeschieden wird. Nimmt man an, daß Amantadin sich gleichmäßig auf den Extrazellulärraum verteilt, so ergibt sich eine wirksame Konzentration von ungefähr $1o^{-6}$ bis $1o^{-5}$ g/ml. In diesem Konzentrationsbereich fand sich in unseren Ergebnissen keine sichere Wirkung auf die Endplatte der Maus.

Es ist allerdings bekannt, daß sich die Empfinglichkeit für depolarisierende und blockierende Substanzen bei Erkrankungen der neuromuskulären Synapse stark verändert. JONES und VRBOVA (27) fanden in Untersuchungen an der neuromuskulären Synapse der Katze heraus, daß nach Reinervation die postsynap-

tische Membran weniger empfindlich für Acetylcholin wird. ALBUQUERQUE und THESLEFF (28) stießen darauf, daß nach Denervation die Schwelle für das Aktionspotential heraufgesetzt ist. Beides verringert den Sicherheitsfaktor der neuromuskulären Übertragung. Die reinervierte Endplatte ist entsprechend empfindlicher gegen d-Tubocurarin.
JONES und VRBOVA (27) berichten ebenfalls, daß die reinervierte Endplatte gegen die depolarisierende Wirkung von Succinylcholin unempfindlich wird, wobei Succinylcholin gleichzeitig einen stärkeren blockierenden Effekt auf sie ausübt. Diese Befunde lassen annehmen, daß die Wirkung einer Droge auf die Endplatte von dem aktuell anatomisch-physiologischen Zustand der Synapse abhängig ist.

In Anbetracht dessen ist eine Wirkung von Amantadin auf die Endplatte bei Erkrankungen mit Denervation und Reinervation (z.B. Myatrophe Lateralsklerose) doch denkbar. Ebenfalls bei Myasthenia gravis, bei der die Endplatte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber blockierenden Substanzen aufweist, könnte Amantadin eine Wirkung auf die neuromuskuläre Übertragung ausüben; außerdem bei Dystrophia myotonica oder Myotonia congenita, bei denen eine veränderte Empfindlichkeit für Substanzen von depolarisationshemmendem Typ beobachtet wurde (29). Bei der klinischen Anwendung von Amantadin sollte man nicht zuletzt daran denken, daß Amantadin die Wirkung von relaxierenden Substanzen an der Endplatte während einer Narkose potenzieren könnte.

Wie schon in der Einleitung erwähnt wurde, gibt es bisher nur sich widersprechende Aussagen über den zentralen Angriffspunkt von Amantadin und dessen therapeutischen Wirkungsmechanismus beim Parkinsonismus. Es konnte nicht geklärt werden, ob der zentrale Amantadineffekt eher durch Angriff am dopaminergen oder am cholinergen System erfolgte.

Einige Autoren (9, 1o) geben Hinweise dafür, daß es sich bei

den cholinergen Synapsen des Striatums um muskarinartige Synapsen handeln könnte.
Bisher konnte an peripheren muskarinartigen Synapsen keine Wirkung von Amantadin nachgewiesen werden. Ein Rückschluß von unseren Befunden am nikotinartigen Acetylcholinrezeptor der Endplatte der Maus auf einen möglichen Angriffspunkt von Amantadin im ZNS erscheint uns aufgrund der erwähnten Argumente sehr unsicher, wenn nicht gar unmöglich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Amantadin-Hydrochlorid (Am-HCl) auf die neuromuskuläre Übertragung wurde mit Hilfe intrazellulärer Ableitung aus einzelnen Muskelfasern des Mäusediaphragmas untersucht. Als Meßgrößen dienten das Ruhemembranpotential und die Amplitude und Frequenz der Miniaturendplattenpotentiale. In einem Konzentrationsbereich von $1o^{-6}$ bis $1o^{-3}$g/ml kann man die Wirkung von Am-HCl an der postsynaptischen Membran (oder dem Acetylcholin-Rezeptor) kennzeichnen als die eines partialen Agonisten mit Acetylcholin. Am-HCl hat einen geringen depolarisierenden und einen - im Vergleich dazu stärker ausgeprägten - blockierenden Effekt.
Unter der Annahme bestimmter vereinfachender Voraussetzungen wurde die Dissoziationskonstante der Amantadin-Acetylcholinrezeptor-Reaktion zu 8,4 x $1o^{-4}$M/l bestimmt.
Die mögliche Bedeutung unserer Befunde bei der klinischen Verabreichung von Am-HCl an Patienten mit pathologischen Veränderungen der neuromuskulären Synapse wurde diskutiert.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. SCHWAB, R.S., ENGLAND, A.C.Jr., POSKANZER, D.C., YOUNG, R.B., (1969)
   Amantadine in the treatment of Parkinson's disease.
   J.Am.med.Ass., 2o8, 1168 - 117o

2. HORNYKIEWICZ, O. (1971)
   Neurochemical pathology and pharmacology of brain dopamine and acetylcholine: rational basis for the current drug treatment of Parkinsonism.
   Contemp.NeurolSer. 8, 33- 65, 1971

3. HORNYKIEWICZ, O. (1972)
   Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction.
   Res.Publ.Assoc.Nerv.Ment. Dis, 5o, 39o - 415, 1972

4. GRELAK, R.B., CLARK, R., STUMP, J.M. and VERNIER, V.G. (197o)
   Amantadine-Dopamine Interaction: Possible Mode of Action in Parkinsonism.
   Science, 169, 2o3 - 2o4

5. STRÖMBERG, U., SVENSON, T.H. and WALDECK, B. (197o)
   On the mode of action of amantadine.
   J.Pharm.Pharmac., 22, 959 - 962

6. STRÖMBERG, U. and SVENSON, T.H. (1971)
   Further studies on the mode of action of amantadine.
   Acta pharmacol. et toxicol, 3o, 161 - 171

7. HEIMANS, R.C.H., RAND, M.J. and FENNESSY, M.R. (1972)
   Some actions of amantadine on peripheral tissues.
   J.Pharm.Pharmac., 24, 869 - 874

8. KUBO, T. and TAGAKI, H. (1967)
A possible mechanism of arrhythmia induced by L-Amantadine.
Jap.J.Pharmacol, 17, 681-682

9. HERZ, A., ZIEGLGANSBERGER, W. (1968)
The influence of microelectrophoretically applied biogenic amines, cholinomimetics and procaine on synaptic excitation in the corpus striatum.
Int.J.Neuropharmacol., 7, 221 - 23o

1o. STEINER, F.A. (1971)
Neurotransmitter und Neuromodulation
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971

11. MARTIN, A.R. (1955)
A further study of statistical composition of the endplate potential.
J. Physiol. 13o, 114 - 122

12. HUBBARD, J.I. and QUASTEL, D.M.J. (1973)
Micropharmacology of vertebrate neuromuskular transmission.
Pharm.Rev., , 199 - 216

13. THESLEFF, S. and QUASTEL, D.M.J. (1965)
Neuromuscular pharmacology.
Ann.Rev.Pharmac., 5, 263 - 284

14. HUBBARD, J.I., LLINAS, R. and QUASTEL, D.M.J. (1969)
Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission
in: Monographs of the Physiological Society, Edward Arnold Ltd., London 1969

15. KARCZMAR, A.G. (1967)
Neuromuscular pharmacology.
Ann.Rev.Pharmac., 7, 241-276

16. FATT, P. and KATZ, B. (1951)
An analysis of the end-plate-potential recorded with an intracellular electrode.
J.Physiol., 115, 32o - 37o

17. KRUCKENBERG, P. and BAUER, H. (1971)
Die Dissoziationskonstante zwischen Curare und dem Acetylcholin-Rezeptor.
Pflügers Arch., 326, 184 - 192

18. NASTUK, W.L. (1971)
Mechanism of neuromuscular blockade.
Ann. N.Y.Acad.Sci., 183, 171 - 182

19. GISSEN, A.J. and NASTUK, W.L. (197o)
Succinylcholine and Dekamethonium Comparison of Depolarisation and Desensitation.
Anesthesiology, 33, 611 - 618

2o. ARIENS, E.J., van ROSSUM, J.M. and SIMONIS, A.M. (1956)
A theoretical basis of molecular pharmacology. Part I Interaction of one or two compounds with one receptor system.
Arzneimittel-Forschung, 6, 282 - 293

21. ARIENS, E.J. and SIMONIS, A.M. (1964)
Cholinergic and anticholinergic drugs, do they act on common receptors?
Ann. N.Y. Acad.Sci., 842 - 867

22. HIGMAN, H.B., PODLESKI, T.R. and BARTELS, E. (1963)
Apparent dissociation constants between Carbamylcholine, d-Tubocurarine and the receptor.
Biochem.Biophys. Acta, 75, 187 - 193

23. ZAIMIS, E.J. (1953)
Motor end-plate diffenrences as a dermining factor in the mode of action of neuromuscular blocking substances.
J.Physiol. (London), 122, 238 - 251

24. BARAKA, A. (1972)
Neuromuscular block in different species.
Acta anaesth.scand., 16, 132

25. THESLEFF, S. (1955)
The effect of acetylcholine, decamethonium and succinylcholine on neuromuscular transmission in the rat.
Acta physiol. scand., 34, 386 - 392

26. BLEIDNER, W.E., HARMON, J.B., HEWES, W.E., LYNES, T.E. and HERMANN, E.C. (1965)
Absorption, distribution and excretion of amantadine-hydrochloride.
J.Pharmacol.exptl. therap., 15o, 484 - 49o

27. JONES, R. and VRBOVA, G. (1972)
Effect of denervation and reinervation on the responses of kitten muscles to Acetylcholine and Suxamethonium.
J. Physiol. (London), 222, 569 - 582

28. ALBUQUERQUE, E.X. and THESLEFF, S. (1968)
A comparative study of membran properties of innervated and chronically denervated fast and slow muscles of the rat.
Acta physiol.scand., 73, 471 - 48o

29. BRIM, V.D. (1973)
Denervation supersensitivity: The response to depolarising muscle relaxants.
Br.J.Anaesth., 45, 222-226

An dieser Stelle möchte ich für die Förderung dieser Arbeit Herrn Prof.H.Schliack danken.
Herrn Dr.Kruckenberg und Frau Dr.Schaible gilt mein Dank für ihre Mitarbeit an dem experimentellen Teil dieser Arbeit und ihre theoretischen Anregungen.
Für die technische Assistenz danke ich Frau Pöhner.

L E B E N S L A U F

27.5.1947	In Athen/Griechenland geboren als Sohn des Zahnarztes Charissis Charissis und seiner Ehefrau Aglaia
1953 - 1965	Volksschule - Gymnasium
1965 - 1966	Studium der Medizin an der Université Libre de Bruxelles
1966 - 1967	wegen schwerer Krankheit des Vaters, der noch im gleichen Jahr verstarb, Abbruch des Studiums. Aufenthalt in Athen.
SS 1967 - SS 197o	Studium der Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen (Vorphysikum - Physikum)
WS 197o/71 - SS 1973	Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin
3.8. 1973	Staatsexamen
1971 - 1973	Experimentelle Arbeit an der Neurologischen Klinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin bei Prof. Schliack über die Wirkung von Amantadin auf die motorische Endplatte
1.11.73 - 28.2.74	Medizinalassistent an der Neurologischen Klinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
1.3.74 - 3o.6.74	Medizinalassistent an der Medizinischen Klinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
1.9.74 - 31.12.74	Medizinalassistent an der Chirurgischen Klinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin